

# Evaluation of preosteoblast MC3T3-E1 cells cultured on a microporous Titanium membrane fabricated using a precise mechanical punching process.

著者	張 井玉
号	53
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	歯博第903号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/00130094">http://hdl.handle.net/10097/00130094</a>

氏 名（本籍）：張<sup>じゃん</sup> 井<sup>じん</sup> 玉<sup>うい</sup>（中国）

学位の種類：博士（歯学） 学位記番号：歯博第903号

学位授与年月日：令和2年9月25日 学位授与の要件：学位規則第4条第1項該当

研究科・専攻：東北大学大学院歯学研究科（博士課程）歯科学専攻

学位論文題目：Evaluation of preosteoblast MC3T3-E1 cells cultured on a microporous Titanium membrane fabricated using a precise mechanical punching process.  
（マイクロピエス加工により生成した微細孔純チタンメンブレン上における前骨芽細胞株 MC3T3-E1 の生物学的特性に関する研究）

論文審査委員：（主査）教授 佐々木 啓 一  
教授 山 田 聡 教授 鈴 木 治

## 論文内容要旨

【目的】歯科インプラント，骨補填材のリテーナーの素材として純チタン（Ti）は有用である一方，組織内に導入した際に，宿主由来細胞がTi表面に付着し，遊走，増殖するプロセスにおいて，その表面のミクロンオーダーの形態が，細胞に及ぼす影響については詳細に知られていなかった。Tiは難加工材であり，その表面に対して，細胞サイズに相当するミクロンレベルの形状を，高精度かつ再現性をもって形成できなかったからである。本研究では，わが国の有する超精密機械加工技術を駆使して加工したチタン箔を用いて，細胞への影響を検索することを目的とした。

【方法】10 $\mu$ m厚のチタン箔に対し，一辺25 $\mu$ mの角穴を75 $\mu$ mピッチで穿孔加工，ナノ精度でコントロールされたピエスアレイ式チタンメンブレン(TiM)を創成した。その上で，Ti上において再現性あるミクロンレベルの表面トポグラフィーが及ぼす，硬組織由来細胞の付着，遊走，増殖および分化への影響を解析した。18,000個/cm<sup>2</sup>の密度で均一な角穴が形成されたTiMでは，穿孔加工の際，パンチが突入した面を“Hheads side”，裏側のパンチが抜けた面を“Tails side”とした。

【結果と考察】SEM観察では，両面ともナノオーダーの正確さで整列した25 $\mu$ m角穴が見られ，Hheads sideは平滑面に縁端のシャープな角孔が配列する一方，Tails sideの角穴は辺縁にバリを生じ，3次元的な起伏を呈していた。TiM上でマウス頭蓋冠由来骨芽細胞株（MC3T3-E1）をFBS添加培地にて培養した。SEMおよび免疫染色顕微鏡像による観察では，播種された細胞はメンブレン両面上において付着，遊走，細胞数増加が見られ，培養21日後においてはTails sideではHheads sideに比べ染色細胞核数において有意に上回っていたが，対照群の加工前チタン箔(Blank)における培養細胞数に比べればいずれも下回っていた。また，Hheads sideではその過程で貫通孔内部とその周辺に細胞が集積する傾向があった。一方，Tails sideでは孔辺縁のバリに細胞体が数多く付着すると共に，貫通孔内部にも集積していた。硬組織誘導能については，オステオカルシン(OCN)遺伝子発現については培養28日後に

において明瞭となり、硬組織誘導培地により増強された。オステオポンチン(OPN)遺伝子発現については培養14日後で明瞭となり28日後で幾分低下した。また硬組織誘導培地により相対的に抑制された。試料各面における比較では、OCN発現はHeads sideにおいて、Tails sideおよびBlankに比べ有意に高く、OPN発現についても同様の傾向が認められた。培養28日後におけるアリザリン染色像では、Tails sideとBlankにおいて石灰化ノジュールが明瞭に発現し、いずれも硬組織誘導培地により増強された。

【結論】以上の結果から、制御されたマイクロトポグラフィーを含むTiMは、硬組織由来細胞における増殖能と石灰化誘導能を有する素材と考えられる。

## 審査結果要旨

本論文は、歯学研究科で創成されたピアスアレイ式チタンメンブレン(TiM)の表面トポグラフィーに着目し、本TiMの骨誘導再生法におけるさらなる可能性について材料学的、生物学的な検討を行ったものである。

本TiMは、わが国の有する超精密機械加工技術を駆使し、10  $\mu$ m厚の純チタン箔に対し、ナノ精度でコントロールされた一辺25  $\mu$ mの角穴を75  $\mu$ mピッチで穿孔加工することにより創成された。その最たる特徴は、ナノオーダーで均一なトポグラフィー、および加工後の裏表におけるトポグラフィーの違いであり、パンチ突入面“Heads side”には縁端のシャープな角孔、反対側の抜け面“Tails side”は辺縁にバリを生じ、3次元的な起伏を呈している。チタン表面の生体親和性、特に微細構造化による細胞活性の増強に関して種々の取り組みがなされており、なかでも生体内のextracellular matrix(ECM)をモチーフに細胞サイズのオーダーで凹凸を形成する粗面処理によるインストール時における細胞付着とその後の組織化を促す生物学的定着能の向上が注目されている。しかし難加工性の純チタンに対し、ECMのような細胞オーダーの微細形状を制御して再現する加工技術が限られており、今なお模索が続いている。本TiMは生体組織構造をモチーフに、再現性をもってそのスケールに迫る微細加工を実現すべく開発を進めたものであり、論文中的SEM像で示されるように世界最小の均一な25  $\mu$ m角穴がナノサイズの公差をもって配列している。

さらに本論文では、このパターン化されたマイクロトポグラフィーに対するマウス頭蓋冠由来骨芽細胞株の反応を解析した。その結果、増殖途上において、貫通孔のエッジやバリによる突起が付着のアンカーとして作用した点が着目された。所見としては穿孔ツールが突き抜けたTails Sideのバリによる突起に細胞が積極的に付着していたこと、穿孔ツールの突入面であるHeads Sideでは、エッジに付着しようとする細胞群の挙動により貫通孔の周囲に細胞が偏在した幾何学的パターンが特徴的であった。チタンを含めて生体親和性素材を利用したティッシュエンジニアリングにおいて、ミクロンオーダーの正確な加工は、生体に対して、逸脱のない一定範囲の作用を供与する上で極めて有用である。

本論文により、本TiMの開発製法が純チタンの持ち味である生体親和性と硬組織誘導能を損なう事無く精密なマイクロトポグラフィーを生成し得たことが確認されたこととともに、本TiMの裏表のトポグラフィーの違いによる細胞応答の違いが示された。これらの知見は、新たな骨誘導再生法の展開への可能性を示したものであり、今後の発展が期待される。

よって本論文は、博士（歯学）に相応しいものと判断される。